

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PROLINA COMO INDICADOR DE OSMOPROTECCIÓN EN DOS ESPECIES DE LA FAMILIA CHENOPODIACEAE

González Luna, A.R.^{a*}, Moreno Limón, S.^a, Núñez González, M.A.^b, Garza Aguirre, R.A.^a,
Sánchez Sánchez, A.A.^a, Guerra Cantú, J.A.^a

a Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Botánica, Pedro de Alba S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

b UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Química Analítica, Pedro de Alba S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

*arg.luna@hotmail.com

RESUMEN

El aumento de sales en los suelos representa una notable amenaza para la supervivencia de las plantas, y repercute consecuentemente en los niveles agroalimentarios, disminuyendo la capacidad de producción y cosecha en los suelos agrícolas generando grandes pérdidas, tanto económicas, como biológicas considerando las áreas de cultivo. En la presente investigación se determinó mediante espectrofotometría de luz visible, el contenido de prolina libre en las hojas, tallos y raíces de *Suaeda nigra* y *Atriplex canescens*, especies de la familia Chenopodiaceae, extraída por diferentes métodos. Los valores promedio del contenido de este aminoácido para ambas especies van de 25.614 a 2.457 $\mu\text{moles/mg}$ para *S. nigra* y *A. canescens* respectivamente. Los métodos de extracción no influyeron en el contenido de prolina de *S. nigra*, mientras que en *A. canescens*, cuando el extracto fue obtenido por el método de macerado más sonificado con dilución previa, los resultados son más altos y estadísticamente diferentes a los obtenidos cuando la muestra fue extraída únicamente por el método de sonificado y con dilución posterior.

ABSTRACT

The increase of salts in the soil, given that this problem represents a significant threat to the survival of plants, and thus consequently impact on agrifood levels, decreasing the production and harvesting capacity in agricultural soils, generating large losses, both economic, such as biological considering the growing areas. In this investigation was determined by spectrophotometry of visible light, the free proline content in leaves, stems and roots of *Suaeda nigra* and *Atriplex canescens*, species of the family Chenopodiaceae, drawn by different methods. The average values of this amino acid content for both species range from 25,614 to 2,457 $\mu\text{moles/mg}$ for *S. nigra* and *A. canescens* respectively. Extraction methods did not influence the proline content of *S. nigra*, while in *A. canescens*, when the extract was obtained by the macerated plus sonicated with prior dilution method, the results are statistically higher than those obtained when the sample was drawn only by the sonication and subsequent dilution method.

Palabras clave: Extracción, Prolina, Osmoprotección

Keys words: Extraction, proline, osmoprotector

Área: Otros

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el incremento de sales en los suelos representa una notable amenaza para la supervivencia de las plantas, y por ende, repercute consecuentemente en los niveles agroalimentarios, disminuyendo la capacidad de producción y cosecha en los suelos agrícolas, generando grandes pérdidas, tanto económicas para el sector productivo, como biológicas considerando las áreas de cultivo.

Globalmente los rendimientos de las áreas destinadas a la agricultura están presentando grandes restricciones debido a la salinización de los suelos, dado que para el año 2002, la FAO estimó que de 20 a 30 millones de hectáreas de tierras de regadío estaban seriamente afectadas por salinidad y de 0.25 a 0.50 millones de hectáreas se perdían anualmente por esta causa (Viswanathan and Zhu, 2003).

Pese a que estos números son alarmantes, se conoce de la existencia de plantas que poseen la capacidad de tolerar y evitar condiciones de salinidad extrema conocidas como halófitas. Actualmente, se ha estudiado el papel que juegan los osmoprotectores (prolina, glicinbetaína, manitol, etc.) en la respuesta al estrés. Por esta razón la importancia de la presente investigación radica en la evaluación de los métodos de extracción y cuantificación de prolina en dos especies de la familia Chenopodiaceae (*Suaeda nigra* y *Atriplex canescens*), para de esta forma seguir enriqueciendo el conocimiento que se tiene sobre la Ecofisiología Vegetal de esta familia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio

El lugar de muestreo corresponde al ejido de San Felipe, el cual se localiza dentro del municipio de Doctor Arroyo, Nuevo León, México, en las coordenadas 100° 17' 57" de longitud Oeste, 24° 06' 03" de latitud Norte, a una altura de 1680 metros sobre el nivel del mar. Actualmente, según datos del INEGI, es considerado como una localidad de alta marginación y cuenta con aproximadamente 90 habitantes. De manera general, las características ecológicas y fisiográficas de esta localidad, corresponden a las que se presentan en el municipio (INEGI, 2009).

Colecta de material

Las muestras vegetales que se colectaron, se separaron de acuerdo a su estructura en hoja, tallo y raíz, y se colocaron posteriormente en bolsas de plástico por separado hasta completar aproximadamente 100 gramos de cada una y se colocaron en hielo con el fin de detener las actividades metabólicas vegetales.

Extracción de prolina libre

Se realizó la siguiente modificación de la técnica de Bates *et al.*, 1973 para cuantificación de prolina: primeramente, para la obtención de los extractos vegetales, se agruparon muestras de 3 g de material foliar cada una (macerado sin nervadura), a las cuales se le aplicaron diferentes métodos de extracción para la obtención de mayor rendimiento. El primer método consistió en colocar 3 g del material foliar en un mortero con 30 mL de ácido sulfosalicílico y posteriormente fueron macerados. El segundo método sustituye la maceración por la sonicación de la muestra a 3 pulsos de 30 segundos haciendo uso del sonicador (marca BRANSON, modelo 150-D). Finalmente, el tercer método consiste en el empleo de los dos métodos anteriormente mencionados. Las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante fue recuperado para posteriormente refrigerarse a 5° C. Posteriormente, para la extracción de prolina libre, se realizaron dos tratamientos por cada método de extracción, buscando evidenciar el método que presente mayor rendimiento al momento de realizar la cuantificación de prolina. El primero de los tratamientos consistió en realizar una dilución previa al extracto vegetal, y el segundo, en realizar una dilución posterior a la extracción.

Se tomó una alícuota de 0.6 mL del sobrenadante recuperado, se añadieron 0.6 mL de ácido 5-sulfosalicílico dihidratado, y se le adicionaron 0.4 mL de Ninhidrina ácida y 0.4 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, se procedió a incubar la mezcla reactiva a 97 °C por 1 hora, y a continuación la reacción se frena con un shock térmico por 5 minutos. Una vez atemperada la muestra, se le adicionó 1 mL de Tolueno, y se homogeneizó el contenido haciendo uso de un vortex (marca Scientific Industries, Inc., modelo G560) por 1 minuto y se deja reposar 5 minutos para poder observar las fases. Finalmente se tomó la fase orgánica del tubo de ensaye (sobrenadante) y se determinó su absorbancia a 518 nm por espectrofotometría de luz visible (marca Thermo Fisher Scientific, modelo Biomate 3). Los resultados fueron interpolados en una curva de calibración de prolina, y se realizaron los cálculos para cuantificar la concentración de prolina en base de peso fresco.

Diseño estadístico

El diseño que corresponde a esta investigación es Factorial AxB completamente al azar. Donde A corresponde a cada una de las dos especies en cuestión y B a cada uno de los métodos de extracción. En general el tratamiento corresponderá al siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = m + F_i + \text{Rep}(F_i) + T_k + (TF)_{ik} + E_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} = Contenido de prolina () i -ésimo método de extracción
 j -ésima repetición, k -ésima especie vegetal

Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza y la Comparación Múltiple de Medias (Tukey) para establecer diferencias mínimas significativas entre las especies y cada uno de los métodos de extracción analizados, respecto al contenido de prolina obtenido.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en relación a los diferentes métodos de extracción de prolina empleados demostraron que existe una amplia variabilidad en cuanto al contenido de prolina entre ambas especies. Para *S. nigra* los valores fluctúan de 4.621 a 54.662 $\mu\text{moles/mg}$. Para esta especie, la mayor concentración promedio de prolina (31.182 $\mu\text{moles/mg}$) se obtuvo con el método de Macerado y Sonicado con dilución previa [M+S (1:2)], y en promedio, el menor contenido (20.011 $\mu\text{moles/mg}$) se obtuvo con el método de Macerado y Sonicado con dilución posterior [M+S (+1)].

Tabla I. Contenido de prolina ($\mu\text{moles/mg}$) de <i>Suaeda nigra</i> y <i>Atriplex canescens</i> obtenida por diferente método de extracción.					
Planta	Tratamiento	Promedio	Error Estándar	Valor Mínimo	Valor Máximo
<i>Suaeda nigra</i>	M (1:2)	29.935	± 5.683	6.149	45.277
	M (+1)	21.403	± 4.278	8.737	38.937
	S (1:2)	31.099	± 5.234	8.467	54.662
	S (+1)	20.059	± 3.801	5.037	31.990
	M+S (1:2)	31.182	± 4.803	9.118	47.425
	M+S (+1)	20.011	± 3.615	4.621	30.526
	Total	25.614	± 1.933	4.621	54.662
<i>Atriplex canescens</i>	M (1:2)	2.725	± 0.155	2.021	3.322
	M (+1)	1.848	± 0.130	1.494	2.484
	S (1:2)	2.084	± 0.288	1.032	3.463
	S (+1)	1.573	± 0.323	0.544	3.236
	M+S (1:2)	3.787	± 0.780	1.880	7.676

<i>Atriplex canescens</i>	M+S (+1)	2.723	± 0.776	0.881	6.086
	Total	2.457	± 0.215	0.544	7.676

Tratamientos: Macerado con dilución previa [M (1:2)]; Macerado con dilución posterior [M (+1)]; Sonicado con dilución previa [S (1:2)]; Sonicado con dilución posterior [S (+1)]; Macerado y Sonicado con dilución previa [M+S (1:2)]; Macerado y Sonicado con dilución posterior [M+S (+1)].

Por otra parte, para *A. canescens*, el contenido de prolina independientemente del método de extracción varía de 0.544 a 7.656 $\mu\text{moles/mg}$. En esta especie, la mayor concentración promedio de prolina (3.787 $\mu\text{moles/mg}$) se presentó cuando las muestras fueron tratadas con el método de Macerado y Sonicado con dilución previa [M+S (1:2)], mientras que con el método de Sonicado con dilución posterior, se presentó el menor contenido (1.573 $\mu\text{moles/mg}$) en promedio (Tabla I). Los resultados obtenidos a través del Análisis de Varianza demostraron que para el contenido de prolina de acuerdo a los diferentes métodos de extracción, no existen diferencias significativas en los resultados de *S. nigra* (Figura 1), mientras que para *A. canescens* si existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes métodos de extracción (Figura 2).

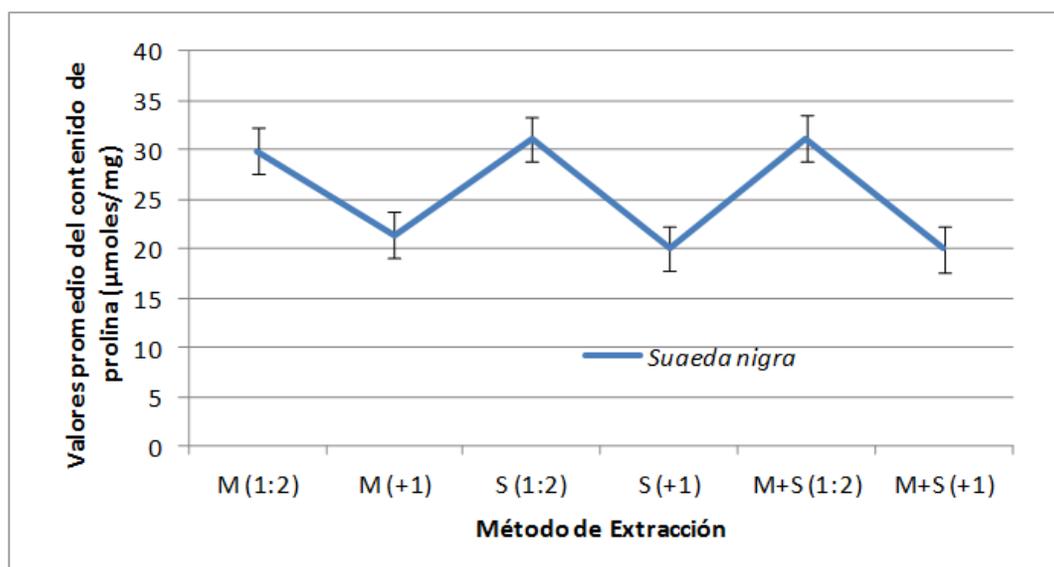


Figura 1. Comparación múltiple de medias para el contenido de prolina ($\mu\text{moles/mg}$) de *Suaeda nigra* obtenida por diferente método de extracción.

En la Figura 2 puede observarse que en *Atriplex canescens* el método de Sonicado con dilución posterior [S (+1)], corresponde al método con menos obtención de prolina (1.573 $\mu\text{moles/mg}$) mientras que con el método de Macerado y Sonicado con dilución previa [M+S (1:2)] registró el mayor contenido de este aminoácido (3.787 $\mu\text{moles/mg}$).

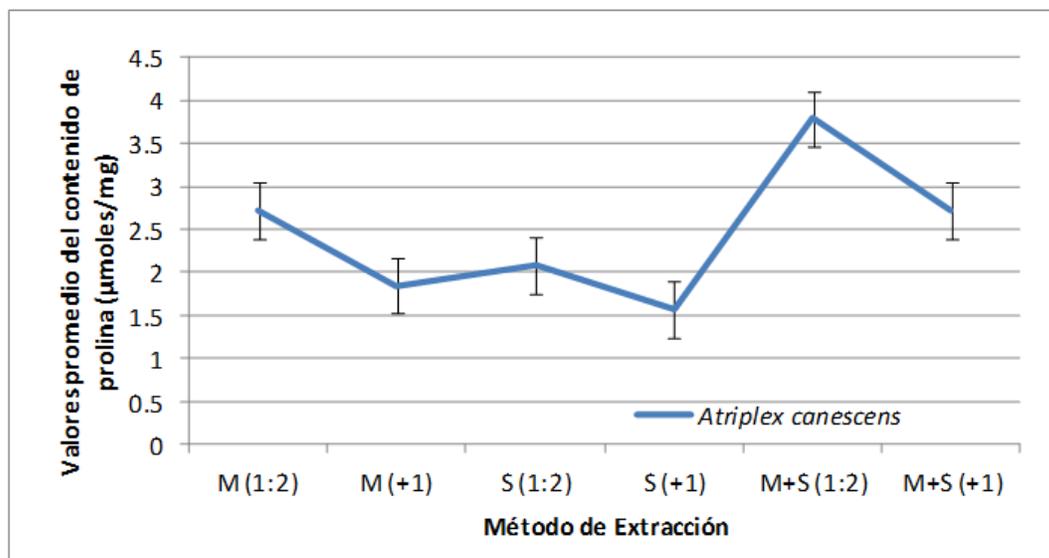


Figura 2. Comparación múltiple de medias para el contenido de prolina ($\mu\text{moles/mg}$) de *Atriplex canescens* obtenida por diferente método de extracción.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, el contenido promedio de prolina, independientemente del órgano vegetativo de donde se extraiga, fluctúa de 4,621 a 54,662 $\mu\text{moles/mg}$ y de 0,544 a 7,676 $\mu\text{moles/mg}$ para *Suaeda nigra* y *Atriplex canescens*, respectivamente. En relación a lo reportado por Moreno *et al.*, 2014, la acumulación promedio de prolina en *Suaeda nigra* se concentra principalmente en la raíz (36,724 $\mu\text{moles/mg}$), seguida por el tallo (31,321 $\mu\text{moles/mg}$) y con menor acumulación en la hoja (8,798 $\mu\text{moles/mg}$), mientras que en *Atriplex canescens*, se concentra principalmente en las hojas (3.951 $\mu\text{moles/mg}$), seguida por la raíz (1.944 $\mu\text{moles/mg}$) y con menor acumulación en el tallo (1.476 $\mu\text{moles/mg}$). Por esta razón, para realizar la evaluación de los diferentes métodos de extracción de prolina, se optó por realizar la extracción a partir del órgano vegetativo que presentara el mayor grado de acumulación del aminoácido libre y de esta forma presentar resultados más veraces.

Con respecto a los resultados que se obtuvieron de los distintos métodos de extracción de prolina, aquellos que involucraron una dilución posterior (Macerado, Sonicado y Macerado mas Sonicado) para ambas especies, resultaron ser poco eficientes debido a los valores que presentaron, por lo que para futuras investigaciones no se recomienda la implementación de este sistema para obtener un mayor volumen final. El déficit en la concentración evidentemente se debe a que el osmoprotector al entrar en contacto con el tolueno agregado posteriormente, hace la función de un agente diluyente y no precisamente de un agente extractor, por lo que en lugar de concentrarse el aminoácido este se va perdiendo de a poco al momento de realizar su cuantificación.

En lo que respecta a los métodos de extracción que involucran la dilución previa (Macerado, Sonicado y Macerado mas Sonicado), estos presentaron los mayores valores de acumulación. Esto se debe principalmente a que, como se mencionaba anteriormente, durante el proceso de extracción, pese a que el volumen final para realizar la lectura sea menor, el extracto que contenga la prolina libre se mantendrá concentrado y, por tanto, la lectura de absorbancia mediante el espectrofotómetro de luz visible será mayor al momento de realizar la cuantificación y se verá reflejado en los valores obtenidos al momento de realizar la conversión a $\mu\text{moles/mg}$.

Finalmente, el método de extracción que resultó con los valores más elevados de cuantificación de prolina libre fue el método de Macerado más Sonicado con dilución previa [M+S (1:2)], el cual es sugerido para la cuantificación de osmoprotectores en futuras investigaciones debido a la notable eficiencia presentada en esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Bates, L., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207.

INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Doctor Arroyo, Nuevo León (online). Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/19/19014.pdf>

Moreno, S., González, R., Garza, R. and Foroughbakhch, R. 2014. Leaf, stem and root content of proline in *Atriplex canescens* and *Suaeda nigra* (Chenopodiaceae). *International Journal of Bio-Resource and Stress Management*.

Viswanathan, C. and Zhu, J.K. 2003. Plant Sal Tolerance. *Topics in Current Genetics*, Vol. 4. *Plant Response to Abiotic Stress*. Pp. 241-270.